昆虫滞育关联热休克蛋白的研究进展

肖海军[1]，魏兆军[2]，薛芳森[1,*]
(1. 江西农业大学昆虫研究所，南昌 330045；2. 合肥工业大学生物与食品工程学院生物工程系，合肥 230009)

摘要：滞育是昆虫逃避不利环境条件的基本方式之一，益虫的合理利用和害虫的综合治理，都离不开对滞育调控机理的研究。滞育可以诱导一些基因表达模式的改变，如热休克蛋白基因的差异表达，导致昆虫抗逆性增强。本文综述了与昆虫滞育关联的热休克蛋白的研究概况，从热休克蛋白与滞育的关联、不同虫态滞育期间热休克蛋白基因的差异表达和滞育相关的蛋白质组学研究几个方面进行了概述。与其他的胁迫反应均诱导热休克蛋白同步上调表达不同，热休克蛋白在不同种类昆虫以及同种昆虫的不同滞育生理阶段的表达模式差别很大。热休克蛋白在滞育期间的表达是决定越冬抗逆性和存活的重要因子之一。本文可为昆虫滞育如何应答环境条件刺激的研究提供参考信息。
关键词：昆虫；滞育；滞育调控；热休克蛋白；蛋白差异表达；蛋白组学
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2011)09-1068-08

Progress in heat shock proteins (Hsps) related to insect diapause

XIAO Hai-Jun[1], WEI Zhao-Jun[2], XUE Fang-Sen[1,*] (1. Institute of Entomology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Department of Biotechnology, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Diapause is one of the primary developmental pathway for insects to escape from unfavorable environment. Knowledge of diapause regulation is essential for rational use of beneficial insects and development of effective pest management strategies. Diapause evokes a unique pattern of gene expression, such as heat shock proteins (Hsps) and acquisition of increased tolerance to environmental stresses. The purpose of this review is to consider the advance on heat shock proteins related to insect diapause, including the relationship between diapause and heat shock proteins, differential expression of heat shock protein gene at different life stages during diapuase and the comparative proteomic analysis between diapause and non-diapause individuals. Unlike other common stress responses that elicit synchronous up-regulation of all Hsps, however, expression of Hsps is different during diapause in different species. The up-regulation of Hsps during diapause is an important factor contributing to overwintering defense strategy and survival. This review may provide some reference to understanding the mechanisms of diapausing insect response to environmental stimuli.
Key words: Insect; diapuase; diapuase regulation; heat shock proteins (Hsps); differential protein expression; proteomics

昆虫是地球上种类数目最多，种群数量巨大，陆地分布区域最广的一类繁盛物种。昆虫在地球上繁衍生息成功的原因有多个方面，除了昆虫身体构造和生理方面与生俱来的优势外，其中重要的两个方面是昆虫生长、发育及繁殖的计划性和抵抗逆境的适应能力(Danks, 1987; Saunder, 2002; MacRae, 2005; 徐卫华, 2008)。昆虫生长、发育及繁殖的计划性体现于昆虫在适宜的环境条件下连续进行生长繁殖；而一旦环境条件不适，则采取休眠(dormancy)或滞育(diapause)状态从时间上逃避不利的环境，或采取迁飞(migration)策略，从空间上逃避不利因素(Danks, 2007; Dingle and Drake, 2007)。滞育是昆虫越冬和越夏的基本方式，充分体现了昆虫生长发育的季节性适应，并诱导昆虫抗逆性增强。滞育可以诱导一些特异基因的差异表达，其中编码热休克类蛋白基因就与滞育有密切关联，而热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)又与抗逆性直接相关(Yocum *et al*., 1998; Goto *et al*.,

基金项目：国家自然科学基金项目(30900946)；教育部高等学校博士点新教师基金(20093603120002)
作者简介：肖海军，男，1980 年生，副教授，主要从事昆虫滞育与迁飞生理生态研究，E-mail：hjxiao@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：xue_fangsen@hotmail.com
收稿日期 Received：2011-01-11；接受日期 Accepted：2011-05-20

1998；Rinehart *et al.*，2000；Yocum，2001；Denlinger，2002；Goto and Kimura，2004；Hayward *et al.*，2005；Tachibana *et al.*，2005；Yocum *et al.*，2005；MacRae，2010）。目前国内外关于滞育研究（徐卫华，1999，2008；王满囷和李周直，2004；MacRae，2005；Koštál，2006；Denlinger，2008；卓德干等，2010）和热休克蛋白研究（李冰祥等，1997；张永强等，2004；王海鸿和雷仲仁，2005；肖春霞等，2006；王薇等，2009；MacRae，2010）两个方面都有综述论文发表。热休克蛋白的产生是昆虫对环境条件的一种适应，深入开展与昆虫滞育相关热休克蛋白研究，可进一步揭示 HSPs 在昆虫滞育生理过程中的作用，其研究不仅在学术上还将在实践中对益虫的合理利用和害虫的综合治理起指导作用。本文针对与昆虫滞育关联热休克蛋白的研究现状进行概述，以期为滞育相关调控分子机理的研究提供参考信息。

1 昆虫滞育与热休克蛋白

滞育是由遗传和环境共同作用导致昆虫生长发育或生殖中止的一种现象，昆虫通常能在不利的气候条件到来之前就已经作好了进入滞育越夏或越冬的准备（Tauber *et al.*，1986；Danks，1987）。滞育在昆虫生活史上有极其重要的作用，昆虫在此阶段通常发育速度减缓，代谢强度降低，抗寒、抗旱与耐热能力提高，极大地增强了昆虫在自然界的生存能力；滞育还使昆虫避开不利环境条件同时，把昆虫的发育阶段与最有利的食物资源和繁殖时机同步起来（Tauber *et al.*，1986；Danks，1987；Saunders，2002）。无论是有益昆虫的合理利用开发，或者是害虫的综合治理，都离不开对其滞育调控机理的深入研究，因此，滞育领域研究也一直受到国内外昆虫学家的关注（Koštál，2006；Denlinger，2008）。

热休克蛋白是细胞或生物体受到一定时间高于其正常生长发育温度即亚致死温度（sub-lethal temperature）热胁迫后，体内新合成的或含量增加的一类遗传上高度保守的蛋白（Ritossa，1962；Gurley and Key，1991）。热休克蛋白在原核生物和真核生物中普遍存在，一些对生物体不利的外界条件，如紫外线照射、缺氧、乙醇、某些重金属离子，以及葡萄糖缺乏、氨基酸类似物、钙离子载体、水分胁迫、胞外 pH 值的变化、病原入侵、低温处理等，均可诱导细胞产生 HSPs（Tissières *et al.*，1974）。目前 HSPs 按相对分子量大小以及同源程度可分为 HSP90，HSP70，sHSP（small heat shock proteins）和泛素（ubiquitin，Ub）4 个家族（Morimoto *et al.*，1994）。昆虫在冷激和热激等不利因素诱导下往往会产生热休克蛋白，它们在昆虫的环境适应和进化中起着分子伴侣的重要作用（Lee and Denlinger，1991；Krebs and Bettencourt，1999；Bettencourt *et al.*，1999；MacRae，2010）。

2 热休克蛋白与滞育的关联

大多数昆虫滞育的启动和终止是由脑内的神经内分泌控制的（Denlinger *et al.*，2005）。依滞育的进程可以将滞育分为诱导（induction）、准备（preparation）、进入（initiation）、维持（maintenance）、解除（termination）和滞育后发育（post-diapause development）6 个生理阶段（Koštál，2006）。尽管当前滞育调控的分子机理仍不太清楚，但是大量研究已表明热休克蛋白与滞育或休眠密切相关（Denlinger，2002；Goto and Kimura，2004；Denlinger，2008）。热休克蛋白的表达通常认为是细胞感受不利环境条件压力导致的，但是，近来越来越多的研究证明，昆虫滞育与某些热休克蛋白基因的表达存在明显的关联性。研究发现，对冬季滞育的昆虫，热休克蛋白基因的上调表达对越冬个体的存活十分重要，Hsps 的表达量是提高昆虫越冬抗寒性的主要决定因子之一，它们在昆虫的环境适应和进化中起着重要作用（Rinehart *et al.*，2007；Denlinger，2008；Doucet *et al.*，2009）。在大多数蝇类中的 Hsps 在滞育期间是上调的，但热休克蛋白 Hsc70 基因的表达不受滞育的影响，而 Hsp90 则是下调的。与其他的胁迫反应均诱导热休克蛋白同步上调表达不同，热休克蛋白在不同种类昆虫以及同种昆虫的不同滞育生理阶段中的表达模式差异很大。由于编码热休克蛋白的 mRNAs 与整个滞育期紧密相联，mRNAs 存在于整个滞育期间，仅在接到开动滞育后发育信号前重新启动发育的几小时内降解。因此，滞育热休克蛋白基因的上调表达始于滞育诱导，并在整个越冬过程中持续表达，直到滞育终止前接到 mRNAs 停止的信号（Rinehart *et al.*，2007）。这种表达模式在双翅目、鳞翅目、鞘翅目和膜翅目等不同的昆虫种类中和不同的滞育虫态（胚胎、幼虫、蛹和成虫）中均有相似性。用 RNAi 技术发现麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 在滞育期间

Hsp23 和 Hsp70 基因的下调表达并没有改变其是否进入滞育和滞育持续时间，但是它大大提高了滞育蛹在低温条件（－15℃）下的存活率（Denlinger, 2002；Rinehart *et al.*, 2007）。

3 不同滞育虫态滞育期间热休克蛋白表达差异

目前，随着生物化学、分子生物学及功能基因组学研究技术的进步，对滞育生理的研究已经从常规生理指标的测定上升到滞育的分子生理的水平，特别是滞育相关基因的差异表达研究已经积累了一定的研究成果（Rinehart *et al.*, 2007；徐卫华, 2008；Denlinger, 2008；Doucet *et al.*, 2009）。其中，滞育相关的热休克蛋白基因的表达和功能研究已成为生物学研究的热点，如热休克蛋白可诱导滞育个体获得更强的耐寒性（Rinehart *et al.*, 2007）。滞育相关 Hsp 基因差异表达主要从转录水平和翻译水平进行比较研究，即针对非滞育个体与滞育个体之间热休克蛋白进行对比研究和越冬进程中热休克蛋白基因的表达变化研究。滞育相关的基因表达可分为不受滞育影响的基因、滞育下调基因、滞育上调基因、滞育期间断续表达的基因和压力反应基因等几种类型；在滞育上调和下调基因中，又可以分为早期表达和晚期表达 2 种情况（Denlinger, 2002）。滞育个体相对于非滞育个体在基因表达上有很大的差异，大部分基因是沉默的，但有些在滞育过程中却显著上调表达（Denlinger, 2002）。

3.1 胚胎滞育（卵滞育）

以胚胎滞育（卵滞育）的昆虫中，舞毒蛾 *Lymantria diapar* 滞育卵中 Hsp70 基因的表达量显著高于非滞育卵（Rinehart *et al.*, 2007）。家蚕 *Bombyx mori* 滞育卵在产下后于 25℃ 下培育 30 d, Hsp20.8A 表达量明显上调，然而，滞育卵在 15℃ 下培育 30 d 或 5℃ 下培育 60 d, Hsp20.8A 表达量下调（Hwang *et al.*, 2007）。Hsp（20.4, 20.8, 40, 70 和 90）在家蚕滞育卵和非滞育卵中均表达，但在组织中上调表达的部位不同，Hsp20.4 在中肠和卵巢，Hsp40 在头部，Hsp70 在表皮，Hsp90 在卵巢和头部（Saravanakumar *et al.*, 2008）。家蚕滞育卵在 25℃ 下维持滞育时（2－102 d），Hsp70a 的表达量逐渐增加。滞育卵从产下后第 2 天起保存在滞育解除的条件（5℃），初期（2～12 d）Hsp70a 表达量迅速增加，随后下降（12～22 d），再缓慢上升（22～102 d）。滞育卵在 5℃ 下处理 20 d 后转到 25℃, Hsp70a 表达量急剧下降，随后持续低水平表达（2～10 d），非滞育卵在 5℃ 下处理时 Hsp70a 的表达亦少量增加（Moribe *et al.*, 2010）。乌苏里拟寰螽 *Paratlanticus ussuriensis* 滞育卵产下后 20 d 以内检测不到 Hsp70 表达，在 30℃ 下培育 50～60 d 后表达量明显上调（Shim *et al.*, 2011）。

3.2 幼虫滞育

以幼虫进入滞育的昆虫中，有 4 种鳞翅目昆虫、1 种膜翅目昆虫和 1 种双翅目昆虫滞育期间 Hsps 基因的差异表达报道。竹蠹螟 *Omphisa fuscidentalis* 3 种热休克蛋白基因在幼虫滞育期间均上调表达，但是在滞育前期（pre-diapause）、滞育期间（diapause）和滞育后发育阶段（post-diapause）的表达模式明显不同，表现为 Hsp70 在滞育前期于脂肪体中大量表达，滞育期间表达量很少；相反，同源性热休克蛋白基因 Hsc70 滞育前期表达量很少，滞育期间，特别是在滞育解除前的后期大量表达；Hsp90 在滞育前期的表达减少了一半，滞育后期则明显减少。而且，表达 Hsp70, Hsc70 和 Hsp90 在滞育进程中的作用也明显不同，Hsp90 可能与滞育维持相关联，而 Hsc70 则与滞育解除相关联，Hsp70 基因的表达与滞育无关（Tungjitwitayakul *et al.*, 2008）。二化螟 *Chilo suppressalis* 在滞育期间 Hsps 的表达模式与竹蠹螟相似，Hsp90 在滞育幼虫表达高于非滞育幼虫，而 Hsc70 的表达量并没有上调，冷激处理非滞育幼虫可以诱导 Hsp90 上调，而滞育幼虫则未显示上调表达。在滞育不同阶段冷激处理可以导致 Hsc70 表达量稍微下降（Sonoda *et al.*, 2006）。蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* 滞育期间两种小分子热休克蛋白 Hsp19.5 和 Hsp20.8 的表达存在差异：非滞育个体中 Hsp19.5 和 Hsp20.8 在不同环境条件（冷激或热激）下的表达模式表现出不同的积累形式。滞育个体中 Hsp19.5 在滞育期间表达量非常稳定，Hsp19.5 在滞育初期开始表达（孵化后 15～25 d），在滞育期间（45～90 d）和滞育后发育阶段（120 d）的表达量仍稳定；而 Hsp 20.8 在滞育初期表达量上调，滞育期间阶段表达下调，在滞育解除时再次上调表达。因此这 2 个 sHsp 在调节滞育中可能起着不同的作用（Gkouvitsas *et al.*, 2008）。蛀茎夜蛾 Hsp70 基因表达量随着滞育进程逐渐下降，而同源性的 Hsc70 和 Hsp83 则在深滞育阶段成倍上调表达。这些研究表明 Hsc70 和 Hsp90 与滞育是密切关联的，可能作用于维持蛋白的结构或活化蜕皮激素（Gkouvitsas *et al.*, 2009a, 2009b）。

丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia Vitripennis* Hsp90 基因的表达量随幼虫滞育的进程而下降（Wolschin and Gadau, 2009）。欧洲玉米螟滞育可以诱导 Hsp70 基因的上调表达（Rinehart *et al.*, 2007）。在丝光绿蝇 *Lucilia sericata* 滞育幼虫体内，Hsp23，Hsp70 和 Hsp90 的表达量在滞育期间无变化（Tachibana *et al.*, 2005）。

3.3　蛹滞育

当麻蝇 *S. crassipalpis* 蛹进入滞育时，Hsp23 在滞育诱导阶段显著上调表达，在滞育期间一直维持高表达量，直到滞育解除。此外，还有 Hsp18，Hsp25 和一种未确定分子量的小分子 Hsp（smHsp），一个类似于 Hsp23 的假基因（Hsp23 pseudogene），Hsp60，Hsp70A 和 Hsp70B 在麻蝇滞育期间均显著上调表达，Hsc70 表达则不受滞育影响，Hsp90 则在滞育期间则表达量下降，Hsps 在滞育期间的表达可能与蜕皮激素的降解有关（Yocum *et al.*, 1998；Rinehart and Denlinger, 2000；Rinehart *et al.*, 2000；Hayward *et al.*, 2005；Rinehart *et al.*, 2007）。苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata* 在滞育期间 Hsp70 的表达与麻蝇的表达模式类似，亦明显上调，但 Hsp90 在滞育期间表达量较稳定（Yocum *et al.*, 2005）。在以蛹滞育越冬的美国核桃实蝇 *Rhagoletis suavis*，苹果实蝇 *Rhagoletis pomonella* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 滞育蛹中 Hsp70 的表达量均明显高于非滞育蛹（Rinehart *et al.*, 2007）。热休克蛋白的表达通常认为是细胞感受高温等不利环境条件压力导致的，但是，Teixeira 和 Polavarapu (2005)在越桔绕实蝇 *Rhagoletis mendax* 冬季滞育蛹中采用 SDS-PAGE 电泳、Western 印迹和特异性单克隆抗体免疫检测热休克蛋白的表达，结果表明：滞育蛹从诱导至解除过程中不经热胁迫处理也能产生 Hsp70。因此，在越桔绕实蝇 *R. mendax* 滞育期间存在热休克蛋白的表达，而且表达量明显受温度热胁迫反应调节，任何阶段的滞育蛹在高温热胁迫后 Hsp70 表达增加。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 滞育蛹脑中 Hsp90 表达量下降，在美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 滞育蛹中 Hsp90 表达量也下降（Chen *et al.*, 2010；Zhang and Denlinger, 2010）。

在不同季节滞育类型的昆虫中，目前仅见对葱蝇 *Delia antiqua* 夏季滞育、冬季滞育和热胁迫反应中 Hsp70 和 Hsp90 基因的表达研究。研究发现 Hsp90 对葱蝇夏季滞育和冬季滞育发育过程中的生理调节机制明显不同。夏季滞育和冬季滞育均提高了 Hsp70 和 Hsp90 的转录水平，且进行冷激或热激处理可以进一步增强 Hsps 的表达。随着滞育持续时间的增长，夏季滞育个体 Hsp90 转录水平逐渐增加，而冬季滞育个体转录水平则上下波动。热激处理可以促进冬季滞育蛹 Hsp70 的表达，但对夏季滞育蛹则没有促进作用。非滞育个体进行冷激或热激处理，Hsp90 的表达亦是上调的。夏季滞育蛹 Hsp70 的转录水平在滞育诱导阶段(0.5 ~2 d)和滞育后发育(18 ~24 d)阶段非常低，在进入滞育后 3 d 转录水平显著升高，随后逐渐降低。冬季滞育蛹 Hsp70 的转录水平在滞育诱导(2 ~4 d)较低，在滞育初期阶段(29 d)显著升高，随后(54 ~109 d)逐渐下降（Chen *et al.*, 2005, 2006；Kayukawa *et al.*, 2005）。

3.4　成虫滞育

以成虫滞育越冬的昆虫，叔白颜果蝇 *Drosophila triauraria* 滞育期间 Hsp70 表达量在滞育成虫与非滞育成虫之间无明显差异。低温可以诱导 Hsp70 的表达，滞育成虫经 －4℃ 处理时 Hsp70 的表达水平比非滞育成虫低，－8℃ 处理则表达无明显差异（Goto *et al.*, 1998）。进一步研究还发现，Hsp23，Hsp26，Hsp83 和 Hsp93 在成虫内的表达量与滞育无明显关联（Goto and Kimura, 2004）。淡色库蚊 *Culex pipiens* 滞育成虫在冷处理和干燥条件下 Hsp70 的表达量均没有增加；而 Hsc70 在滞育初期的雌蚊头部表达量下降（Rinehart *et al.*, 2006；Li *et al.*, 2009）。马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 在成虫滞育期间，Hsp70A 上调表达，而 Hsp70B 表达量无变化（Yocum, 2001）。越冬熊蜂 *Bombus terrestris* 蜂王 Hsps 基因的组织特异性表达研究发现 sHsp，Hsc70 和 Hsp90 在不同阶段及包括脑、胸部肌肉、肠和卵巢等不同组织的表达量不同，且各种组织中的 Hsps 均有其独特的作用。在越冬期间各生理阶段，Hsc70 和 Hsp90 在整个越冬期间表达模式相似，滞育后期和滞育后发育阶段肌肉中的 Hsc70 和 Hsp90 表达量都下降，卵巢中在低温处理期间 Hsc70 和 Hsp90 表达下调，但在脑和消化道中表达量稳定。经历一个月低温处理后，sHsp 在脑中的表达量下降，而在卵巢中的表达量上升；在肌肉和消化道中表达量稳定（Kim *et al.*, 2008）。

因此，在任何一种昆虫中，并不是所有的热休克蛋白都与滞育完全关联，而且热休克蛋白在不同滞育阶段的功能都可能不同（MacRae, 2010）。

4 昆虫滞育相关的蛋白组学研究

目前，蛋白组学方法是研究昆虫滞育过程中蛋白调控机理中非常有效的手段。通常，滞育与非滞育昆虫个体脑组织表达的蛋白种类不一样，一般在非滞育个体脑中表达的蛋白种类要比滞育个体多。如用脉冲标记和双向凝胶电泳技术对麻蝇 *S. crassipalpis* 脑中表达的蛋白种类进行分析表明，非滞育麻蝇脑内有 300 种蛋白表达，而滞育麻蝇的脑内约有 180 种蛋白表达，但是，其中有 14 种蛋白基因在滞育期间特异表达(Joplin *et al*., 1990)。利用毛细管液相色谱串联质谱(Nano-LC/MS/MS)技术检测到冬季滞育麻蝇 *S. crassipalpis* 蛹的脑有 37 种蛋白表达量上升或特异表达，有 43 种蛋白表达量下降或不表达，热激蛋白 Hsp70 和 sHsp 在滞育过程中表达量显著提高(Li *et al*., 2007)。结合二维凝胶电泳和质谱技术对麻蝇 *S. crassipalpis* 蛹滞育解除后 24 h 内脑蛋白的变化情况进行蛋白质组学分析，结果显示 20 种蛋白表达有明显变化，3 种蛋白仅在滞育蛹的脑中表达；在滞育解除后表现出最明显变化的蛋白中，有 1 种显著增加，7 种减少，2 种消失(Li *et al*., 2009)。小麦吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 滞育进程中(滞育前期、越夏滞育、越冬滞育和滞育后)的蛋白质组分析表明：在滞育前期的幼虫提取物中约检测到 300 个蛋白点，而其他滞育阶段则只检测到 275 个蛋白点。在所检测到的蛋白质点中，滞育前期、滞育期间和滞育解除后几天不同阶段中表达的蛋白质点数量和种类差异明显，有 34 个蛋白质点在所有时期均表达，但各时期的表达量存在显著差异。越夏滞育、越冬滞育和滞育后阶段与滞育前期相比，分别有 91，92 和 95 个蛋白质点显示超过 2 倍的变化丰度。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术对不同滞育期间差异最大的 8 个蛋白点的功能进行分析，根据肽质量指纹图谱对照 NCBInr 数据库，成功鉴定了 7 个蛋白的功能(Cheng *et al*., 2009；成卫宁等，2010)。针对棉铃虫 *H. armigera* 滞育蛹和非滞育蛹脑的蛋白质组学分析共鉴定了 24 种头部蛋白质的功能，这些蛋白包括细胞骨架蛋白，热休克蛋白、昆虫发育调节因子、腺苷三磷酸酶、调节信号通路蛋白和代谢酶等。应用蛋白质技术对滞育蛹和非滞育蛹分析发现有 3 个蛋白仅在非滞蛹存在，6 个蛋白呈现 2 倍或 0.5 倍差异变化。差别表达的蛋白质包括 Hsp90、几丁质脱乙酰酶、α 微管蛋白、内质网腺苷三磷酸转移酶等。鉴定这类蛋白质可以有效地帮助我们更好地了解这些蛋白对昆虫滞育的调节功能(Chen *et al*., 2010)。采用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)结合银染进行蛋白质组分析和基于 Pro-Q Diamond 染色方法的磷酸化蛋白质组分析非滞育和滞育蛹脑差异表达的蛋白，发现 79 种蛋白和 23 种磷酸化蛋白表达量明显不同，采用 MALDI-TOF/TOF MS 技术鉴定了 41 个蛋白和 10 种磷酸化蛋白，并进一步分析了差异表达的基因。非滞育和注定滞育个体之间差异表达的蛋白分别在代谢变化、压力反应和信号传送通路方面起调控作用(Lu and Xu, 2010)。鉴于目前蛋白质组学技术对仪器设备要求相对较高，因此昆虫滞育相关的蛋白质组学分析仍相对有限，但是从现有几例滞育关联蛋白质组学分析来看，国内外滞育研究团队亦逐渐增加了在这一领域的研究投入。

5 小结与展望

针对不同滞育类型的昆虫，在不同滞育阶段开展其生理代谢和相关热休克蛋白基因差异表达的比较研究，有助于进一步深入了解昆虫滞育进程中对逆境的耐受机制，也可以为进一步探明昆虫种群的夏季滞育和冬季滞育适应进化开拓思路。目前，针对冬季滞育的生理生态以及分子水平上都进行了大量的研究，然而，夏季滞育的相关研究相对而言则明显较少。滞育 Hsps 等的分子调控的研究同样存在严重的偏向性，滞育 Hsps 研究取得的进展基本都是基于对冬季滞育的研究结果，对夏季滞育的 Hsps 相关基因差别表达的研究有待进一步深入。夏季滞育的生理变化及 Hsps 表达与冬季滞育存在明显差异，而对夏季滞育类型的相关研究又明显缺乏，因此，开展夏季滞育的分子生理学研究就显得非常重要。目前，随着果蝇 *Drosophila* spp.、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、家蚕 *B. mori*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*、印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* 和佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* 等昆虫全基因组序列的测定和公布，昆虫功能基因组的研究正在世界范围内掀起热潮。从分子水平、基因组、蛋白质组等方面开展夏季滞育、冬季滞育和非滞育昆虫个体与滞育关联热休克蛋白表达模式的比较研究将有望得到进一步拓展。

参 考 文 献（References）

Bettencourt BR, Feder ME, Cavicchi S, 1999. Experimental evolution of Hsp70 expression and thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53(2): 484 – 492.

Chen B, Kayukawa T, Monteiro A, Ishikawa Y, 2005. The expression of the *HSP90* gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Molecular Biology*, 14(6): 697 – 702.

Chen B, Kayukawa T, Monteiro A, Ishikawa Y, 2006. Cloning and characterization of the HSP70 gene, and its expression in response to diapauses and thermal stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(6): 749 – 758.

Chen LZ, Ma WH, Wang XP, Niu CY, Lei CL, 2010. Analysis of pupal head proteome and its alteration in diapausing pupae of *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, 56(3): 247 – 252.

Cheng WN, Li XL, Yu F, Li YP, Li JJ, Wu JX, 2009. Proteomic analysis of pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae). *European Journal of Entomology*, 106(1): 29 – 35.

Cheng WN, L i YP, Yang J, Xu XL, Wu JX, 2010. Two-dimensional electrophoresis of proteins in the pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin). *Acta Phytophylacica Sinica*, 37(1): 7 – 11. [成卫宁，李怡萍，杨杰，许向利，仵均祥，2010. 麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫蛋白质双向电泳分析. 植物保护学报，37(1): 7 – 11]

Danks HV, 1987. Insect Dormancy: An Ecological Perspective. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods), Monograph Series 1. National Museum of Natural Sciences, Ottawa. 439 pp.

Danks HV, 2007. The elements of seasonal adaptations in insects. *Canada Entomologist*, 139(1): 1 – 44.

Denlinger DL, 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*, 47: 93 – 122.

Denlinger DL, 2008. Why study diapause? *Entomological Research*, 38(1): 1 – 9.

Denlinger DL, Yocum GD, Rinehart JP, 2005. Hormonal Control of Diapause. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 3: Endocrinology. Elsevier, Amsterdam. 615 – 650.

Dingle H, Drake VA, 2007. What is migration? *BioScience*, 57(2): 113 – 121.

Doucet D, Walker VK, Qin W, 2009. The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8): 1404 – 1418.

Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A, 2008. Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.). *Journal of Insect Physiology*, 54(12): 1503 – 1510.

Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A, 2009a. Cognate Hsp70 gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Molecular Biology*, 18(2): 253 – 264.

Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A, 2009b. Expression of the Hsp83 gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Molecular Biology*, 18(6): 759 – 768.

Goto SG, Kimura MT, 2004. Heat-shock-responsive genes are not involved in the adult diapause of *Drosophila triauraria*. *Gene*, 326(4): 117 – 122.

Goto SG, Yoshida KM, Kimura MT, 1998. Accumulation of *Hsp70* mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Journal of Insect Physiology*, 44(10): 1009 – 1015.

Gurley WB, Key JL, 1991. Transcription regulation of the heat-shock response: a plant perspective. *Biochemistry*, 30(1): 1 – 12.

Hayward SAL, Pavlides SC, Tammariello SP, Rinehart JP, Denlinger DL, 2005. Temporal expression patterns of diapause-associated genes in flesh fly pupae from the onset of diapause through post-diapause quiescence. *Journal of Insect Physiology*, 51(6): 631 – 640.

Hwang JS, Go HJ, Goo TW, Seong SI, Yun EY, Ahn MY, Kim SR, Park KH, Kim I, Jeon JP, Kang SW, 2007. Molecular characterization of small heat shock protein (hsp20.8A) form the silkworm, *Bombyx mori*. *International Journal of Industrial Entomology*, 15(1): 75 – 78.

Joplin KH, Yocum GD, Denlinger DL, 1990. Diapause specific proteins expressed by the brain during the pupal diapause of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 36(10): 775 – 779, 781 – 783.

Kayukawa T, Chen B, Miyazaki S, Itoyama K, Shinoda T, Ishikawa Y, 2005. Expression of mRNA for the t-complex polypeptide-1, a subunit of chaperonin CCT, is upregulated in association with increased cold hardiness in *Delia antique*. *Cell Stress and Chaperones*, 10(3): 204 – 210.

Kim BG, Shim JK, Kim DW, Kwon YJ, Lee KY, 2008. Tissue-specific variation of heat shock protein gene expression in relation to diapause in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Entomological Research*, 38(1): 10 – 16.

Koštál V, 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52(2): 113 – 127.

Krebs RA, Bettencourt BR, 1999. Evolution of thermotolerance and variation in the heat shock protein, Hsp70. *American Zoologist*, 39(6): 910 – 919.

Lee REJr, 1991. Principles of insect low temperature tolerance. In: Lee REJr, Denlinger DL eds. Insects at Low Temperature. Chapman & Hall, New York. 17 – 46.

Li AQ, Michaud MR, Denlinger DL, 2009. Rapid elevation of Inos and decreases in abundance of other proteins at pupal diapause termination in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(4): 663 – 671.

Li AQ, Popova-Butler A, Dean DH, Denlinger DL, 2007. Proteomics of the flesh fly brain reveals an abundance of upregulated heat shock proteins during pupal diapause. *Journal of Insect Physiology*, 53(4): 385 – 391.

Li BX, Cai HL, Chen YL, 1997. Insect heat shock response and heat shock proteins. *Acta Entomologica Sinica*, 40(4): 417 – 427. [李

冰祥, 蔡惠罗, 陈永林, 1997. 昆虫的热休克反应和热休克蛋白. 昆虫学报, 40(4): 417-427]

Lu YX, Xu WH, 2010. Proteomic and phosphoproteomic analysis at diapause initiation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Proteome Research*, 9(10): 5053-5064.

MacRae TH, 2005. Diapause: diverse states of developmental and metabolic arrest. *Journal of Biological Research*, 3: 3-14.

MaeRae TH. 2010. Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 2405-2424.

Moribe Y, Oka K, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2010. Expression of heat shock protein 70a mRNA in *Bombyx mori* diapause eggs. *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1246-1252.

Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C, 1994. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C eds. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1-30.

Rinehart JP, Denlinger DL, 2000. Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 9(6): 641-645.

Rinehart JP, Li AQ, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL, Denlinger DL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(27): 11130-11137.

Rinehart JP, Robich RM, Denlinger DL, 2006. Enhanced cold and desiccation tolerance in diapausing adults of *Culex pipiens*, and a role for Hsp70 in response to cold shock but not as a component of the diapause program. *Journal of Medical Entomology*, 43(4): 713-722.

Rinehart JP, Yocum GD, Denlinger DL, 2000. Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6): 515-521.

Ritossa FM, 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 15(12): 571-573.

Saravanakumar R, Ponnuver KM, Qadri SMH, 2008. Expression of metabolic enzyme genes and heat-shock protein genes during embryonic development in diapause and non-diapause egg of multivoltine silkworm *Bombyx mori*. *Biologia*, 63(5): 737-744.

Saunders DS, 2002. Insect Clocks. 3rd ed. Pergmon Press, Oxford. 576 pp.

Shim JK, Bang HS, Lee KY, 2011. High temperature interrupts initial egg diapause in *Paratlanticus ussuriensis* and induces expression of a heat shock protein 70 gene. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, doi:10.1016/j.aspen.2011.08.002.

Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, Yoshida H, Tsumuki H, 2006. Cloning of heat shock protein genes (*hsp90* and *hsc70*) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63(1): 36-47.

Tachibana SI, Numata H, Goto SG, 2005. Gene expression of heat-shock proteins (Hsp23, Hsp70 and Hsp90) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. *Journal of Insect Physiology*, 51(6): 641-647.

Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S, 1986. Seasonal Adaptions of Insect. Oxford University Press, New York and Oxford. 550 pp.

Teixeira LAF, Polavarapu S, 2005. Expression of heat shock protein 70 after heat stress during pupal diapause in *Rhagoletis mendax* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98(6): 966-972.

Tissières A, Mitchell HK, Tracey UM, 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84(3): 389-398.

Tungjitwitayakul J, Tatun N, Singtripo PT, Sakurai S, 2008. Characteristic expression of three heat shock-responsive genes during larval diapause in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. *Zoological Science*, 25(3): 321-333.

Wang HH, Lei ZR, 2005. Current developments of heat shock proteins in insect. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(10): 2023-2034. [王海鸿, 雷仲仁, 2005. 昆虫热休克蛋白的研究进展. 中国农业科学, 38(10): 2023-2034]

Wang MQ, Li ZZ, 2004. The research advance of insect diapause. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 28(1): 71-76. [王满困, 李周直, 2004. 昆虫滞育的研究进展. 南京林业大学学报(自然科学版), 28(1): 71-76]

Wang W, Han LL, Zhao KJ, 2009. Research advance of heat shock protein 70 in insects. *Journal of Northeast Agricultural University*, 40(11): 129-132. [王薇, 韩岚岚, 赵奎军, 2009. 昆虫热休克蛋白 Hsp70 的研究进展. 东北农业大学学报, 40(11): 129-132]

Wolschin F, Gadau J, 2009. Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*. *PLoS ONE*, 4(7): e6394.

Xiao CX, Du YZ, Qiang CK, 2006. Present situation on heat shock proteins of insects. *Guangdong Agricultural Science*, 5: 110-112. [肖春霞, 杜予州, 强承魁, 2006. 昆虫热休克蛋白研究概况. 广东农业科学, 5: 110-112]

Xu WH, 1999. Advances in insect diapause studies. *Acta Entomologica Sinica*, 42(1): 100-107. [徐卫华, 1999. 昆虫滞育的研究进展. 昆虫学报, 42(1): 100-107]

Xu WH, 2008. Advances in insect diapause. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(4): 512-517. [徐卫华, 2008. 昆虫滞育研究进展. 昆虫知识, 45(4): 512-517]

Yocum GD, 2001. Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. *Journal of Insect Physiology*, 47(10): 1139-1145.

Yocum GD, Joplin KH, Denlinger DL, 1998. Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(9): 677-682.

Yocum GD, Kemp WP, Bosch J, Knoblett JN, 2005. Temporal variation

in overwintering gene expression and respiration in the solitary bee *Megachile rotundata*. *Journal of Insect Physiology*, 51 (6): 621 – 629.

Zhang Q, Denlinger DL, 2010. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *Journal of Insect Physiology*, 56(2): 138 – 150.

Zhang YQ, Wang JJ, Ding W, Zhao ZM, 2004. Heat shock proteins in insects. *Entomological Knowledge*, 40(1): 16 – 19. [张永强, 王进军, 丁伟, 赵志模, 2004. 昆虫热休克蛋白的研究概况. 昆虫知识, 40(1): 16 – 19]

Zhuo DG, Li ZH, Men XY, Yu Y, Zhang AS, Li LL, Zhang SC, 2010. Advances in insect diapuase. *Shandong Agricultural Science*, (8): 86 – 90. [卓德干, 李照会, 门兴元, 于毅, 张安盛, 李丽莉, 张思聪, 2010. 昆虫滞育研究进展. 山东农业科学, (8): 86 – 90]

（责任编辑：袁德成）